

**Genfrequenzuntersuchungen
für den Galaktokinasedefekt im Zigeunerreservat
Torony/Westungarn**

von
Hans-Dieter Seibert
aus
Hamburg-Harburg

1976 № 2 23



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546220_0023

Aus der Kinderklinik mit Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. A. Windorfer

**Genfrequenzuntersuchungen
für den Galaktokinasedefekt im Zigeunerreservat
Torony/Westungarn**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Hans-Dieter Seibert

aus

Hamburg-Harburg

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer
Referent: Prof. Dr. F. C. Sitzmann
Korreferent: Prof. Dr. A. Windorfer

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Mai 1976

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Der Galaktosestoffwechsel	4
II. Enzymopathien	5
1. Gal-1-PUT-Mangel	5
2. Galaktokinasemangel	6
III. Galaktokinasedefekt in der Literatur und Fragestellung eigener Untersuchungen	7
IV. Eigene Untersuchungen	9
1. Probandengut	9
2. Methodik	9
a) Reagenzien	9
b) Herstellung des Hämolysates	10
c) Hämoglobinbestimmung	10
d) Aktivitätsbestimmung	11
e) Berechnung der Galaktokinase- aktivität	12
3. Fehlerquellen der Methodik	12
V. Ergebnisse eigen Untersuchungen	13
1. Mittelwerte	13
2. Histogramme	13
3. kumulative Häufigkeit	14
4. Stabilität des Enzyms	20
VI. Diskussion der Befunde mit Berechnung der Genfrequenz	23
VII. Zusammenfassung	30
VIII. Literaturverzeichnis	31

I. Der Galaktosestoffwechsel

Galaktose ist die 4-stereoisomere Form der D-Glukose. Als eine Komponente der Laktose ist Galaktose eine große Energiequelle für den kindlichen Organismus, am Aufbau von Glykolipiden, Glykoproteinen und Mucopolysacchariden beteiligt und hat spezifische antigene Eigenschaften in der Bakterienzellwand (5).

Der Galaktosestoffwechsel findet hauptsächlich in der Leber, in den Erythrozyten und in der Niere statt (5). Die wechselweise Umwandlung von Galaktose und Glukose erfolgt auf dem von Leloir beschriebenen Weg (21). Abbauege, die ohne Umwandlung in Glukose verlaufen, sind nur auf bestimmte Mikroorganismen und andere niedere Lebewesen beschränkt (9).

Abb. 1 zeigt im Leloirweg die ersten 4 Reaktionsschritte, die von spezifischen Enzymen katalysiert werden.

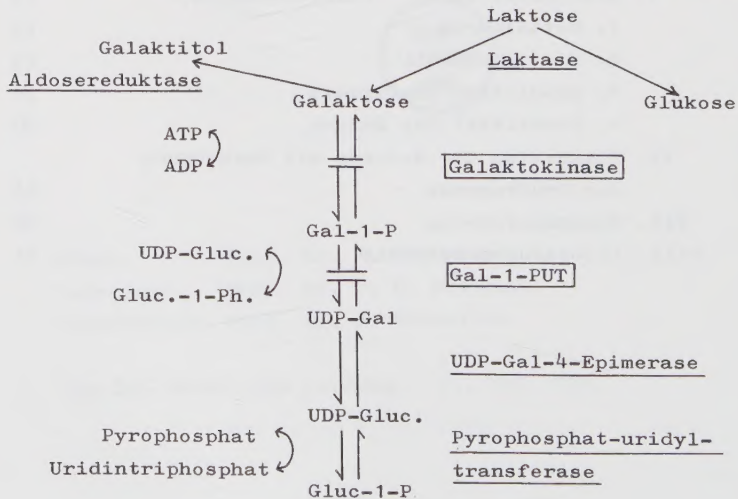


Abb.1: Schema des Galaktosestoffwechsels mit Enzymdefekten

Erläuterungen:

ADP, ATP = Adenosindi-, triphosphat
Gal-1-P, Gluc-1-P = Galaktose-, Glukose-1-Phosphat
Gal-1-PUT = Galaktose-1-phosphat-uridyl-transferase
UDP-Gal, UDP-Gluc = Uridindiphosphatgalaktose, -glukose

II. Enzymopathien im Galaktosestoffwechsel

3 Enzyme katalysieren den Umbau der Galaktose in Glukose: Galaktokinase, Galaktose-1-phosphat-uridyl-transferase, und Uridindiphosphat-Galaktose-4-Epimerase. Bis jetzt sind 2 Enzymblockierungen bekannt. Bei einem Block der Galaktokinase resultiert das Krankheitsbild des Galaktokinasemangels. Ist der 2. Reaktionsschritt durch einen Mangel an Gal-1-PUT gestört, so entwickelt sich die lebensbedrohliche Erkrankung der Galaktosämie.

Beide Erkrankungen sind angeboren und werden rezessiv vererbt, da die Eltern galaktosämischer Kinder in der Regel frei von Erkrankungen auf Grund dieser Enzymdefekte, die Geschwister zum Teil gesund sind und keine Geschlechtsspezifität festzustellen ist (15).

1. Gal-1-PUT-Mangel

Fehlt das Enzym Gal-1-PUT, so kann die phosphorylierte Galaktose nicht mehr abgebaut werden. Es kommt zu einem Anstau von Gal-1-P und folglich bei exogenem Galaktoseangebot zur Reduktion von Galaktose zu der Polyolverbindung Galaktitol (12). Mit Tierexperimenten konnte Quan-Ma nachweisen, daß nach Fütterung toxischer Galaktosemengen Galaktitol sich vor allem in der Augenlinse, im Gehirn, im Skelett- und Herzmuskel anhäufte (31). Bei der Galaktosämie wie auch beim Galaktokinasemangel werden im Harn stark erhöhte Galaktitolkonzentrationen gemessen. (13)

Die durch den Gal-1-PUT-defekt bedingte Erkrankung ist die klassische Galaktosämie, unter den angeborenen Stoffwechselkrankheiten wohl eines der häufigsten Leiden (14). Bei der Fütterung von Milch an das homozygote Kind ergeben sich eine Reihe ernster Symptome. Neben der Ausbildung von Katarakten bestehen meist Lebervergrößerung, Zirrhose, verstärkter Ikterus, geistige Retardierung, Durchfälle und häufiges Erbrechen, Gewichtsabnahme, Glukosurie, Aminoazidurie und ein erhöhter Blutzuckerwert (17). Diese Enzymopathie kann einen foudroyanten Verlauf nehmen und innerhalb weniger Tage undiagnostiziert zum Tode führen (32). Frühdiagnose und Frühtherapie, nämlich die laktosefreie Ernährung sind entscheidend für die Prognose der Erkrankung (32,17).

2. Galaktokinase-Mangel

Gitzelmann beschrieb 1965 den ersten Fall eines Galaktokinasemangels (11). Bei dieser Erkrankung fehlt das Enzym oder ist in seiner Aktivität soweit eingeschränkt, daß fast keine Aktivität in den Erythrozyten nachzuweisen ist (33).

Auffällige klinische Symptome finden sich nicht. Lediglich die Galaktoseausscheidung im Harn bei Ernährung mit Milchzucker und die ab den ersten Lebenswochen zunehmende Kataraktbildung (12,30) weisen auf die Erkrankung hin. Für die Kataraktenstehung dürfte wie beim Gal-1-PUT-mangel die Anreicherung von Galaktitol in der Linse verantwortlich sein(22).

Die Diagnose des Galaktokinasemangels ist schwierig, da augenscheinliche Symptome fehlen, und Katarakte in den ersten Lebenswochen lange Zeit übersehen werden (33). Ein positiver Guthrie-Test bei einem Neugeborenen sollte immer auch an Galaktosämie und Galaktokinasemangel denken lassen. Enzymbestimmungen sind durchzuführen und

das Kind ist laktosefrei zu ernähren, da bei rechtzeitiger Diagnose und entsprechender Diät die Linsenveränderungen reversibel sein dürften (14).

III. Galaktokinase-Defekt in der Literatur und Fragestellung eigener Untersuchungen

Gitzelmann beschrieb 1965 erstmals den Galaktokinasedefekt (11) bei einem 43-jährigen Zigeuner mit Neurofibromatosis Recklinghausen. Eine Schwester dieses Patienten wies den gleichen Enzymdefekt auf (12). Eine Konsanguinität der Eltern konnte festgestellt werden. Den ersten Fall eines Galaktokinase mangels bei einem Neugeborenen entdeckten Thalhammer et al. (34) in einer Zigeunerfamilie aus Wien. Bis heute wurden noch 11 weitere Fälle von Galaktokinase mangel beschrieben. (Tab.1) Linneweh berichtete über ein Neugeborenes mit Galaktokinasedefekt, dessen Eltern dunkelhäutige Schausteller (Zigeuner) und blutsverwandt waren (23). Monteleone (27) und Levy et al. (22) konnten bei ihren Patienten Blutsverwandtschaft in der Aszendens anamnestisch ermitteln, Kaloud et al. (14) eine Konsanguinität nicht völlig ausschließen.

Alle Autoren stellten bei den homozygot Erkrankten massive bis zarte Linsentrübungen, Galaktoseausscheidung im Harn und eine Galaktosämie fest. Einige Patienten wiesen weitere klinische Befunde auf: Neurofibromatosis Recklinghausen (11), Hepatosplenomegalie (34), cerebrale Anfälle (30), leichte EEG-veränderungen und mäßige Ossifikationsbeschleunigung (14).

Über die Häufigkeit des Galaktokinasedefektes auf Grund von Genuntersuchungen gibt es in der Weltliteratur nur spärliche Hinweise (25,16). Genfrequenzuntersuchungen erlauben eine Aussage darüber, welche Bedeutung dieser Erkrankung vom populationsgenetischen Standpunkt zu-

kommt, und wie groß das Risiko für die Bevölkerung ist, entweder homozygot oder heterozygot krank zu sein (16); denn auch Heterozygote mit einer um die Hälfte verminderten Galaktokinaseaktivität gegenüber Gesunden (25) können nach Galaktosezufuhr Katarakte entwickeln, wie Beutler et al. (4), Monteleone et al. (27) und Kaloud et al. (14) nachweisen konnten.

Bei der Häufung der Fälle von Galaktokinasemangel in Zigeunerfamilien liegt es nahe, Genfrequenzuntersuchungen in der Zigeunerbevölkerung durchzuführen. Aus ethnologischen Untersuchungen und Blutgruppenbestimmungen in Slowenien (1) geht hervor, daß Zigeuner genetisch als nahezu isolierte Bevölkerungsgruppe mit einer hohen Sanguinitätsrate zu betrachten sind.

Fragestellung

Die Reproduzierbarkeit der Methode zur Galaktokinasebestimmung und die Möglichkeit, homozygote und heterozygote Merkmalsträger von Gesunden gut abzugrenzen, wurde bereits in früheren Untersuchungen bestätigt. In der vorliegenden Arbeit sollte die Genfrequenz der Zigeunerbevölkerung im ungarischen Reservat Torony, Komitat Vas ermittelt werden. Für die Bestimmung von Vergleichswerten erhielten wir Blutproben vom Bluttransfusionsinstitut Szombathely. Nach langen Verhandlungen mit den Behörden in Ungarn wurde die Genehmigung zur Blutentnahme in den Zigeunerreservaten erteilt.

IV. Eigene Untersuchungen

1. Probandengut

Insgesamt wurden 1411 Blutproben untersucht. 287 Probanden waren reinrassige Zigeuner, 837 Proben stammten aus der Zigeunerbevölkerung des Reservates Torony. Aus dem Transfusionsinstitut in Szombathely wurden 287 Proben von Blutspendern entnommen.

Das Venenblut wurde mit ACD-stabilisator im Verhältnis 4:1 entnommen und mit 20 mM Glukose versetzt. Als Expreßgut wurden die Blutproben in Mikrogefäßen verschickt und waren 3 bis 4 Tage nach Entnahme in Erlangen. Die Proben wurden sofort im Kühlschrank aufbewahrt. Das Datum der Abnahme und das Alter der Probanden wurden mitgeteilt, auf eine Geschlechtsaufteilung wurde verzichtet.

2. Methodik

a) Reagenzien

Die Aktivitätsbestimmung der Galaktokinase wurde nach der Methode von Beutler und Mitarbeitern durchgeführt (3). Wir verwendeten 1-C^{14} -Galaktose von New England Nuclear in einer Konzentration von 0,05 mC.

Das für die Bestimmung benötigte Reaktionsgemisch setzt sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

NaF	100 mM
MgCl ₂	100 mM
Tris-HCl	1 M
Galaktose	7,6 mM
1-C^{14} -Galaktose	10 $\mu\text{C/ml}$
ATP	12 M

1-C^{14} -Galaktose, NaF, Galaktose 7,6 mM, Galaktose 1 M und ATP wurden tiefgefroren aufbewahrt.

Vom Reaktionsgemisch wurden 20 ml angesetzt, 4 Stunden bei 37 °C inkubiert und bis zur Verwendung tiefgefroren, mindestens jedoch 24 Stunden. Vor jeder Bestimmung wurde das in Mikrogefäßen abgefüllte Reaktionsgemisch und 1 M Galaktose langsam bei Zimmertemperatur aufgetaut und gut durchmischt.

b) Herstellung des Hämolysates

Die Blutproben wurden kurz durchmischt, davon 0,5 ml entnommen und 30 Sekunden in der Eppendorf-einheit zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Erythrozyten wurden noch zweimal mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen, zentrifugiert und dekantiert. Von den gepackten Erythrozyten wurden 0,1 ml entnommen und zu 0,4 ml -mercaptoäthanol 7 mM pipettiert. Dabei wurde die Blutpipette dreimal ausgeblasen. Das Gemisch Erythrozyten/Alkohol wurde 10 Minuten gerüttelt und 20 Minuten tiefgefroren. Anschließend wurde das Hämolysat langsam aufgetaut, durchmischt und 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Mikrogefäße gefüllt, das Sediment verworfen.

c) Hämoglobinbestimmung

50 µl Hämolysat wurden zu 10 ml Transformationslösung Biochemica Test Combination (Boehringer) pipettiert, durchmischt und nach 20 Minuten die Extinktion bei 546 nm in Glasküvetten (d=1 cm) am Eppendorf-Photometer gemessen.

Der Hämoglobingehalt in g/100 ml wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Hb} = E_{546} \cdot f_{\text{Hb}} \cdot \frac{10 + V_{\text{Hb}}}{10} \cdot \frac{0,02}{V_{\text{Hb}}}$$

f_{Hb} = 41,8 (**E**ichfaktor nach Verdünnungsreihe ermittelt)

V_{Hb} = Volumen des Hämolysates (50 μl)

E_{546} = Extinktion

d) Aktivitätsbestimmung

100 μl Hämolysat werden zu 100 μl Reaktionslösung pipettiert, kurz durchmischt und davon mit der gleichen Pipette 100 μl zu 40 μl Galaktose 1M gegeben. Die restlichen 100 μl , bestehend aus Hämolysat und Reaktionsgemisch, werden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Die 140 μl Hämolysat, Reaktionsgemisch und 1M Galaktose werden 1 Minute gerüttelt und 50 μl entnommen und punktförmig auf DEAE-Plättchen (Whatman DE 81, Durchmesser 2,3 cm) aufgetragen. Die Filterplättchen liegen auf CO₂-Schnee. Das Gemisch gefriert schnell und kann zum Trocknen auf eine Styroporplatte gesteckt werden. Diese Plättchen trocknen 24 Stunden bei Zimmertemperatur und liefern den A_{100} -wert.

Vom gleichen Gemisch werden 2 Plättchen für die Bestimmung des Leerwertes A_0 angefertigt und filtriert.

Die inkubierten Lösungen werden nach 1 Stunde Ansatzzeit entnommen, 50 μl abpipettiert, auf Plättchen gebracht und filtriert: A_{60} -wert.

Zum Filtrieren verwendet man einen Sartorius-Membran-Filter, durch den 600 ml Aqua bidest von Zimmertemperatur abgesaugt werden. Die Filtierzeit betrug für jeden Wert 4 Minuten. Nach dem Trocknen werden die Plättchen in Vials gelegt und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt. Diese Lösung besteht aus 4 g Omnifluor in 1 Liter Toluol (NEN Chemicals).

Die Messung erfolgte mit einem Packard Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 3380 in 2 oder 5 Minuten.

e) Berechnung der Galaktokinaseaktivität

Die Aktivität der Galaktokinase wird in mU pro g Hämoglobin angegeben und aus folgender Formel errechnet:

$$U = \frac{(A_{60} - A_0) \cdot C \cdot 100}{A_{100} - b_g} \cdot \frac{1}{Hb \cdot T \cdot 0,5}$$

A_{60} = Aktivität der Probe nach 60 Minuten
Inkubation

A_0 = Aktivität des Leerwertes

C = Konzentration der Galaktose im Ansatz

b_g = background, Leerwert der Zählung

T = Inkubationszeit (60 Minuten)

3. Fehlerquellen der Methodik

Bei der Gewinnung des Hämolsates ist die Pipettenspitze nach Aufnahme der gepackten Erythrozyten sorgfältig zu reinigen und die Pipette mehrmals mit Mercaptoäthanol-lösung nachzuspülen und auszublasen.

Wird die Messung des Hämoglobinwertes zu früh vorgenommen, so ergeben sich fälschlich erniedrigte Werte.

Entscheidenden Einfluß auf die Galaktokinaseaktivität hat die richtige Herstellung des Reaktionsgemisches.

Frisch angesetzte Lösungen ergaben niedrifiere Werte als Lösungen, die bei 37 °C für 4 Stunden inkubiert wurden.

Für den exakten Ablauf der Reaktionen beim A_0 -, A_{100} - und A_{60} -wert ist gründliches Durchmischen mit dem Rüttler der Eppendorfeinheit erforderlich. Dies gilt auch für die aufgetauten Lösungen.

Die Filtrierzeit wurde auf 4 Minuten begrenzt. Längere Spüldauer ergab eine Erhöhung der gemessenen Aktivität; umgekehrt waren bei zu starkem Sog der Wasserstrahlpumpe

die Werte gegenüber der Norm erniedrigt.

Die Fehler bei unterschiedlicher Zähldauer von 2, 5 bzw. 10 Minuten im Szintillationsspektrometer ist gering.

Wie schon in früheren Untersuchungen konnte bei Vergleich der einzelnen Meßwerte eine stärkere Schwankungsbreite der A_{60} -werte als der A_{100} - oder der Nullwerte bestätigt werden.

V. Ergebnisse eigener Untersuchungen

1. Mittelwerte

Insgesamt wurden 1411 Probanden untersucht. Für die verschiedenen Altersklassen ergaben sich folgende Mittelwerte:

Alter (Jahre)	4-14	15-20	21-40	41-60	61-77	78-82
Mittelwert (mU/gHb)	27,52	25,41	25,45	25,55	25,98	24,29
Standardabweichung	$\pm 5,90$	$\pm 5,21$	$\pm 5,53$	$\pm 5,50$	$\pm 5,52$	$\pm 4,61$
Anzahl	170	203	553	312	149	20

Tab. 1: Mittelwerte in 6 Altersklassen

4 Werte aus der Klasse 21 bis 40 Jahre wurden für die Berechnung des Mittelwertes nicht berücksichtigt. 2 Werte lagen deutlich unter (3,6 mU/gHb; 10,5 mU/gHb) und 2 Werte über dem durchschnittlichen Aktivitätsbereich (59,8 mU/gHb; 70,8 mU/gHb).

2. Histogramme

Reservat Torony und Blutspender: Abb.2

1411 Blutproben von Probanden aus dem Reservat Torony und dem Transfusionsinstitut Szombathely wurden auf Galaktokinaseaktivität untersucht und die Werte in einem Histogramm dargestellt.

Reservat Torony: Abb. 3

1124 Blutproben von Probanden aus dem Reservat Torony (einschließlich reinrassige Zigeuner) wurden auf Galaktokinaseaktivität untersucht und die Befunde in einem Histogramm dargestellt.

Reinrassige Zigeuner: Abb. 4

287 Blutproben von reinrassigen Zigeunern aus dem Reservat Torony wurden auf Galaktokinaseaktivität untersucht und die Befunde in einem Histogramm dargestellt.

Blutspender: Abb. 5

287 Blutproben aus dem Transfusionsinstitut Szombathely wurden auf Galaktokinaseaktivität untersucht und die Befunde in einem Histogramm dargestellt.

3. Kumulative Häufigkeit: Abb. 6

Zur Berechnung der kumulativen Häufigkeit wurden 1407 Werte in 10 Klassen eingeteilt. Die Klassenabstände betragen je 3 mU/gHb. Die erste Klasse beginnt mit 15, die letzte endet mit 46 mU/gHb. Unter 15 mU/gHb kann das Vorliegen eines Heterozygotenstatus angenommen werden. Die Anzahl der Werte in den einzelnen Klassen wurde ermittelt und die prozentuale Häufigkeit errechnet. Diese Befunde wurden auf Wahrscheinlichkeitspapier mit linearer Abszisse und logarithmischer Ordinate aufgetragen.

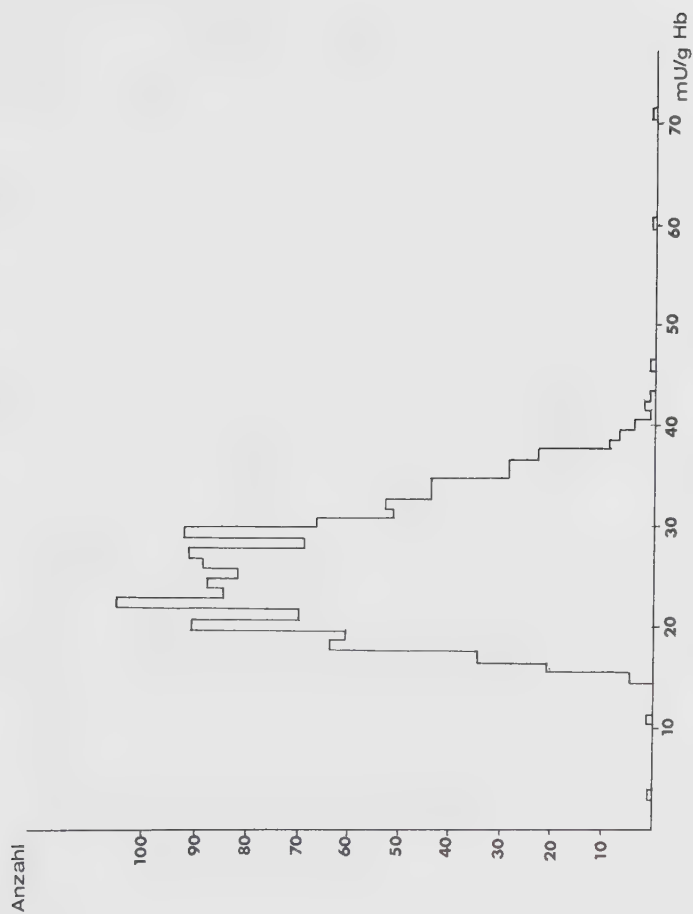


Abb. 2: Histogramm der Aktivitätsverteilung ($n = 1411$)

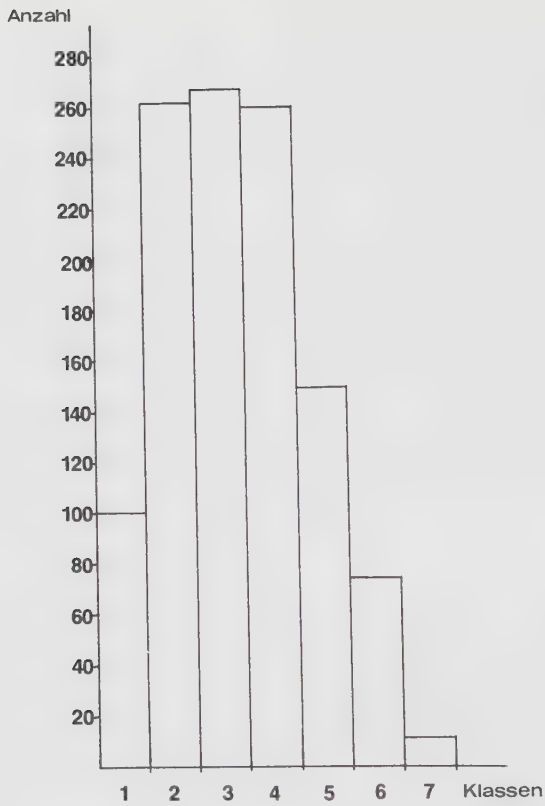


Abb. 3: Histogramm der Probanden aus dem Reservat Torony. (n=1124)

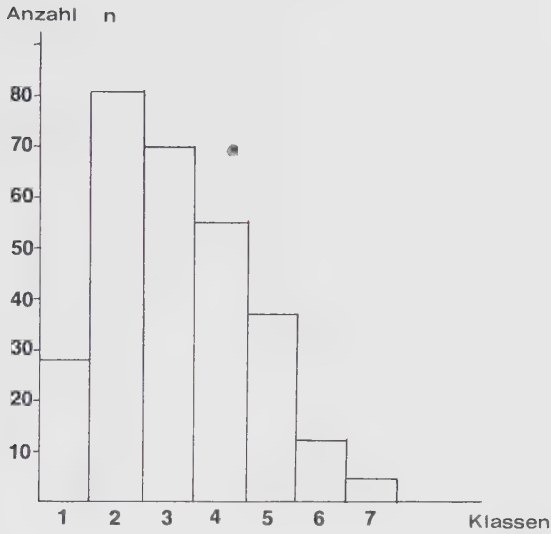


Abb. 4: Histogramm bei reinrassigen Zigeunern
(n = 287)

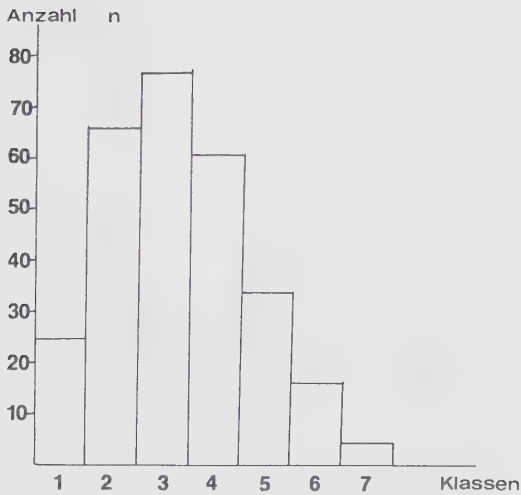


Abb. 5: Histogramm bei Blutspendern (n = 283)

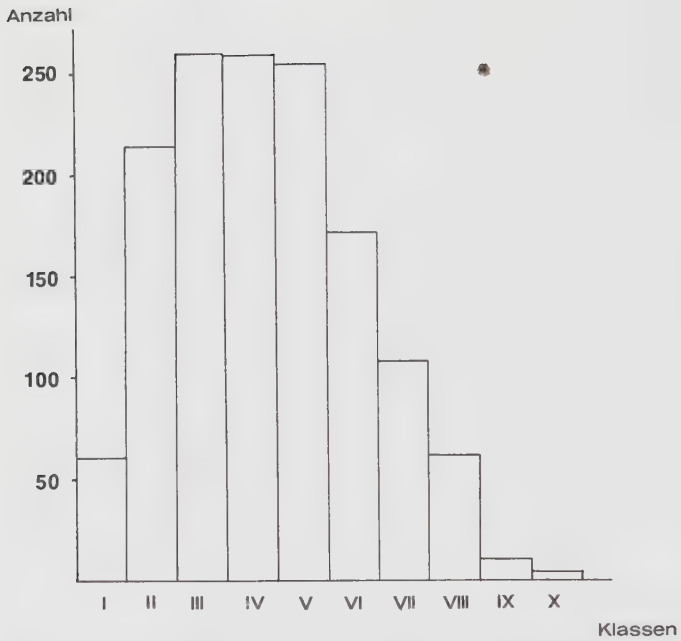


Abb. 6: Histogramm der Aktivitätsverteilung von
1407 Werten in 10 Klassen eingeteilt.

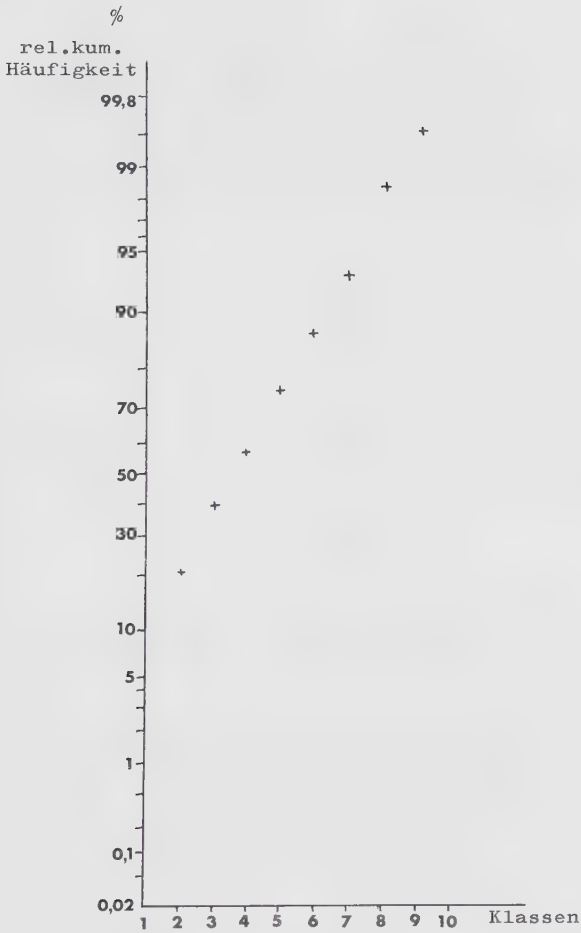


Abb. 7: Überprüfung auf die Art der Verteilung
Abszisse linear, Ordinate logarithmisch
unterteilt.

4. Stabilität des Enzyms

Zur Stabilitätskontrolle des Enzyms Galaktokinase und zur Überprüfung der Präzision der Methode wurden mehrere Versuche durchgeführt.

Von einer Blutprobe wurde der Ausgangswert bestimmt in mU/gHb.

19,3

22,0

21,8

24,5

17,2

18,2

23,0

24,0

19,8

25,9

$$M = 21,6 \pm 2,87$$

Für die weiteren Bestimmungen wurden je eine ACD-stabilisierte Blutprobe im Kühlschrank bei 4 °C und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Hämolysat der gleichen Probe wurde im Kühlschrank, bei Raumtemperatur und tiefgefroren gelagert.

Nach 2, 4, 6 und 8 Tagen wurden von den 5 Proben je 10 Galaktokinasebestimmungen durchgeführt. Es ergaben sich folgende Mittelwerte in mU/gHb:

Tage	H _{Raum}	H _{kühl}	H _{Eis}	B _{Raum}	B _{kühl}
2	13,8	16,2	9,1	21,8	22,0
4	2,6	11,8	4,2	20,1	21,5
6	2,8	11,3	3,1	21,5	21,0
8	—	5,7	3,5	17,6	21,8

H_{Raum} = Hämolysat bei Raumtemperatur
 $H_{\text{Kühl}}$ = Hämolysat im Kühlschrank (4°C)
 H_{Eis} = Hämolysat tiefgefroren (-20°C)
 B_{Raum} = ACD-Blut bei Raumtemperatur
 $B_{\text{Kühl}}$ = ACD-Blut im Kühlschrank

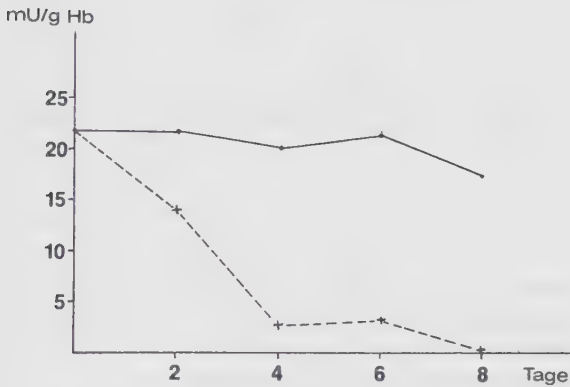


Abb. 8: Stabilität des Enzyms Galaktokinase in ACD-Blut (•—•) und in Hämolysat (+----+) bei Raumtemperatur.

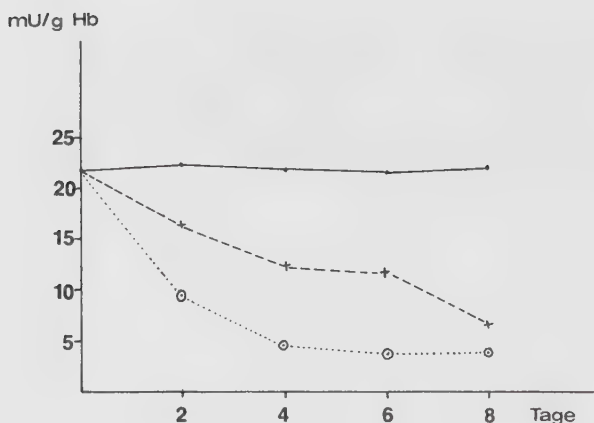


Abb. 9: Stabilität des Enzyms Galaktokinase in
ACD-Blut bei 4 °C (—•—),
Hämolysat bei 4 °C (+----+) und in
Hämolysat bei -20 °C (o.....o)

Die mit ACD-Stabilisator versetzten Blutproben zeigen bei Raumtemperatur und bei 4 °C im Kühlschrank 6 Tage lang konstante Galaktokinaseaktivität. Nach 8 Tagen war im ACD-Blut bei Raumtemperatur ein Aktivitätsabfall um 19 % festzustellen.

Im Hämolysat betrug der Verlust an Galaktokinaseaktivität nach 2 Tagen 25 bis 57 % und nach 8 Tagen 73 bis 100 %. Die Befunde sind in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt.

VI. Diskussion der Befunde mit Berechnung der Genfrequenz

Die Galaktosämie durch Gal-1-PUT-mangel gehört neben Mucoviscidose und Phenylketonurie zu den häufigsten angeborenen Stoffwechselerkrankungen. Galaktosämiker bieten die bekannten ersten Symptome.

Beim Galaktokinasemangel ist die Galaktokinaseaktivität nahe Null oder fehlt völlig. Uridyltransferase- und Epimeraseaktivität sind normal (34). Patienten mit Galaktokinasedefekt sind unfähig, Galaktose zu phosphorylieren, und so kommt es zu einem Anstau von Galaktose im Blut und in anderen Körperflüssigkeiten (12). Hohe Galaktosekonzentrationen aktivieren die Aldosereduktase, welche die Umwandlung von Galaktose in Galaktitol katalysiert. Dieses Dulcitol ist vermutlich das schädliche Agens der Kataraktentstehung (12).

Unterschiedlich zur Galaktosämie scheint die Kataraktbildung das einzige Symptom des Galaktokinasemangels zu sein. Die Diagnose ist schwierig, da Katarakte in den ersten Lebenswochen praktisch nicht auffallen. Milchunverträglichkeit, verlängerter Ikterus, erhöhter Blutzuckerspiegel oder reduzierende Stoffe im Harn sollten an Galaktokinasemangel denken lassen (14). Ein positiver Guthrie-Test hat aber keine endgültige Aussagekraft (14); ebenso schließt die Abwesenheit von Galaktose im Urin die Diagnose nicht aus (22). Exakt kann der Galaktokinasedefekt nur durch Aktivitätsbestimmungen des Enzyms, elektrophoretisch (39) und durch Galaktosebelastung (15) diagnostiziert werden. Wird nach frühzeitiger Diagnose die Galaktose aus der Nahrung abgesetzt, ist die Rückbildung bereits eingetretener Linsenveränderungen zu erwarten (16).

Neben Homozygoten müssen auch heterozygote Merkmalsträger abgegrenzt werden, die eine um die Hälfte verminderte Enzymaktivität gegenüber Gesunden aufweisen (25). Das Auffinden der Heterozygoten ist wichtig, da auch sie Katarakte entwickeln und das krankmachende Allel übertragen können (14).

Beutler et al. (4), Monteleone (27) und Kaloud/Sitzmann (14) konnten Katarakte bei Heterozygoten nachweisen. Über milde Formen von Galaktokinase-mangel berichtete Beutler 1971 (3). Er untersuchte 210 Katarakt-patienten. Unter 92 Probanden, deren Katarakte sich im ersten Lebensjahr entwickelt hatten, wurden 2 Galaktokinasedefekte gefunden. Diese Gruppe wies eine signifikant erniedrigte Aktivität gegenüber den Patienten auf, deren Katarakte sich erst später bildeten. Kaloud und Sitzmann wiesen bei der Mutter eines homozygot erkrankten Kleinkindes eine um 75% erniedrigte Galaktokinaseaktivität nach (15). Die Kindes-mutter hatte an beiden Augen Katarakte.

Aus insgesamt 1407 Werten wurde ein Mittelwert berechnet:

$$M = 25,70 \pm 5,38 \text{ mU/gHb} \quad (n = 1407)$$

Für das Reservat Torony ergibt sich unter 1124 Werten ein Mittelwert von

$$M = 25,66 \pm 5,47 \text{ mU/gHb} \quad (n = 1124)$$

Davon waren 287 Werte reinrassigen Zigeunern zuzuordnen. Der Mittelwert beträgt

$$M = 24,93 \pm 5,89 \text{ mU/gHb} \quad (n = 287)$$

287 Blutspender wurden untersucht. 4 der ermittelten Werte waren unbrauchbar.

$$M = 25,09 \pm 5,63 \text{ mU/gHb} \quad (n = 283)$$

Vergleicht man diese Befunde mit den Mittelwerten anderer Autoren (Tab.2), die auch nach der modifizierten Methode nach Beutler et al. (3) arbeiteten, so ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung.

Autor	Mittelwert mU/gHb
Beutler	32,23 $\pm$ 10,65
Monteleone	19 - 30
Levi	15 - 32
Kaloud/Sitzmann	26 $\pm$ 5,8

Tab. 2: Mittelwerte anderer Autoren

Die Mittelwerte (Tab. 1) weisen annähernd konstante Werte in den Altersklassen 15 bis 77 Jahre auf. Dagegen liegt der Mittelwert der ersten Klasse 7,1 % über und der Mittelwert der letzten Altersklasse 5,5 % unter dem mittleren Mittelwert von 25,70 mU/gHb.

Ng. et al. (28) fanden bei Neugeborenen eine Galaktokinaseaktivität, die dreimal höher liegt als bei Erwachsenen, im weiteren Lebensalter kontinuierlich abfällt und bei 3 bis 6 Jahren die Aktivität der Erwachsenen erreicht.

Diese Autoren fanden auch eine breite Streuung der Werte in den einzelnen Altersklassen.

Tedesco (36) berichtete, daß der Mittelwert für Galaktokinaseaktivität in der Negerbevölkerung niedriger liege als Vergleichswerte der weißen Bevölkerung.

Die Histogramme (Abb. 2 bis 5) weisen für die Galaktokinaseaktivität annähernd eine Normalverteilung auf mit einem relativ steilen Anstieg in den ersten Klassen. Bei der Darstellung der kumulativen Häufigkeit (Abb.6) ergab sich eine Gerade. Somit ist auch im Vergleich mit der übrigen Weltliteratur eine Normalverteilung anzunehmen.

Für die Berechnung der Heterozygoten ergibt sich:

$$25,70 - 10,76 = 14,94 \text{ mU/gHb}$$

8 Werte liegen unter dieser 2s-Grenze und sind als fraglich heterozygot anzusehen.

Berechnung der Genfrequenz

Die Genfrequenz wird nach der Hardy-Weinberg-Formel berechnet:

$$p = \frac{2 \text{ AA} + \text{Aa} + \text{aa}}{2 \cdot (\text{AA} + \text{Aa} + \text{aa})}$$

$$q = 1 - p$$

$$2pq = \text{Heterozygotenfrequenz}$$

Für das Reservat Torony ergibt sich bei 4 Heterozygoten unter 1124 Probanden eine Heterozygotenfrequenz von 1 : 282. Dies entspricht einer Homozygotenfrequenz von 1 : 318000.

Unter 287 reinrassigen Zigeunern wurde ein Heterozygoter ermittelt. Diese Befunde ergeben eine Heterozygotenfrequenz von 1 : 288 und eine Homozygotenfrequenz von 1 : 331700.

Unter 287 Blutspendern des Transfusionsinstitutes Szombathely wurden 4 Heterozygote ermittelt. Daraus errechnet sich eine Heterozygotenfrequenz von 1 : 73 und eine Homozygotenfrequenz von 1 : 21300.

Mayes und Guthrie fanden bei 642 Probanden 6 Heterozygote und eine Homozygotenfrequenz von 1 : 46000. (25)

Cook (6) schätzt die Homozygotenfrequenz auf 1 : 100000.

Er hatte 42 Kinder und Jugendliche im Alter von 3 bis 19 Jahren mit lange bestehenden Katarakten untersucht, konnte aber keinen Galaktokinasedefekt feststellen.

Bei 107 Kindern einer Blindenschule konnten Mayes und Guthrie (25) keinen Galaktokinasmangel nachweisen.

Monteleone untersuchte mehrere Kinder mit Katarakten, ohne einen Galaktokinasmangel zu diagnostizieren (27).

Beutler (4) bestimmte die Galaktokinase von 210 Kataraktpatienten und teilte die Befunde nach dem Alter der Pro-

banden bei Kataraktentstehung in 5 Klassen ein. In der ersten Gruppe, den Katarakten des ersten Lebensjahres, fanden sich 2 Defekte und eine signifikante Aktivitätsminderung gegenüber den anderen Klassen.

Vergleichende Genfrequenzuntersuchungen für den Galaktokinase-mangel wurden von Kaloud und Sitzmann (16) in der Steiermark und in Franken durchgeführt. In Tabelle 3 werden diese Ergebnisse und die eigenen Werte dargestellt.

Land	n	Heterozygote	Homozygote
Steiermark	997	8	1 : 62500
Franken	888	5	1 : 126000
Summe	1885	13	1 : 84000
Torony	1124	4	1 : 318000
Blutspender	287	4	1 : 21300
Summe	1411	8	1 : 125300

Tab. 3: Vergleich der Genfrequenzen zwischen Steiermark, Franken und den eigenen Befunden.

Bei den eigenen Untersuchungen ergibt sich für das Reservat Torony eine sehr niedrige Homozygotenfrequenz im Vergleich mit den Werten aus Steiermark und Franken. Gute Übereinstimmung zeigt dagegen die Homozygotenfrequenz aus der Gesamtzahl der eigenen Untersuchungen mit der Genfrequenz aus Franken.

Eine Häufung des Galaktokinasedefektes in der Zigeunerpopulation, wie Gitzelmann (12) und Thalhammer (34) vermuten, konnte durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Aus den Befunden sind vorerst keine endgültigen Schlußfolgerungen zu ziehen, da weitere Untersuchungen in Zigeunerreservaten durchgeführt werden. Bei parallel laufenden Untersuchungen für den Gal-PUT-defekt wurden 1 Homozygoter und 4 Heterozygote gefunden. Die Sippe des Patienten wurde untersucht und ein Stammbaum erstellt.

Pickering (30) schlug vor, Galaktokinase und Gal-1-PUT gleichzeitig von einer Probe zu bestimmen. Mit dem Quotienten beider Werte ließen sich heterozygote Merkmalsträger leichter von Gesunden abgrenzen. Auf regionale Unterschiede über die Häufigkeit angeborener Stoffwechselanomalien weisen einige Autoren hin. Thalhammer und Scheiber (35) fanden für die Galaktosämie und Phenylketonurie signifikante Frequenzunterschiede in Ost- und Westösterreich. Frequenzbestimmungen, die durch Screening-Tests für angeborene Stoffwechselkrankheiten erstellt wurden, weisen erhebliche Differenzen in 8 europäischen Ländern auf (37). Genetische Faktoren dürften für diese regionalen Unterschiede im Vordergrund stehen (16), sowie der Grad der Durchmischung oder Isolierung einzelner Bevölkerungsgruppen (16) und hinreichende Häufigkeit für die Auswertung von Genfrequenzen (35).

Katarakte sind wahrscheinlich das einzige Symptom des Galaktokinasemangels. Inwieweit andere Störungen durch den Galaktokinasedefekt verursacht werden, kann derzeit nicht entschieden werden. Bei 4 homozygot Erkrankten wurden weitere zusätzliche Befunde festgestellt: M. Recklinghausen (11), generalisierte Krämpfe (30), Hepatosplenomegalie (34), Ossifikationsbeschleunigung und leichte EEG-veränderungen (14).

Screening-Tests bei Neugeborenen (35), pränatale Enzymbestimmung aus Amnionzellen (30) oder Nabelschnurblut (22) und frühzeitige laktosefreie Ernährung können eine Kataraktentstehung und Erblindung der Kinder verhindern.

Mayes und Guthrie (25) wiesen einen raschen Aktivitätsverlust der Galaktokinase in gefrorenen Erythrozyten nach und zeigten, daß die Aktivität des Enzyms während eines Zeitraumes von 8 Tagen in 4°C gekühlten Blutproben gut stabil bleibt. Die Aktivitätsminderung im tiefgefrorenen Hämolysat beträgt nach Ng et al (28) 20% nach einem Tag

und 90% nach 6 Tagen. Pickering (30) stellte bei tiefgefrorenen Erythrozyten nach 24 Stunden 40% und nach 6 Tagen 90% Aktivitätsverlust fest. Die Werte der vorliegenden Arbeit mit 57% Aktivitätsabfall nach 2 Tagen und 85% nach 6 Tagen in tiefgefrorenem Hämolysat und die Stabilität in ACD-Blut stimmen mit den Werten dieser Autoren überein.

VII. Zusammenfassung

Der Galaktokinasedefekt ist ein autosomal-rezessiv vererbtes Stoffwechselleiden, dessen rechtzeitige Erkennung ein Erblinden der Kinder verhindern kann. Aus früheren kasuistischen Berichten über diesen Stoffwechseldefekt kann angenommen werden, daß dieses Leiden gehäuft bei Zigeunern vorkommt.

Wir haben daher bei 1124 Probanden aus einem Zigeunerreservat in Westungarn (Torony) Blutproben auf die Aktivität der Galaktokinase untersucht. Die Aktivitätsbestimmung wurde nach der modifizierten Methode von Beutler und Mitarbeitern durchgeführt, mit der Frage, ob bei Zigeunern dieses Reservates der Galaktokinasedefekt ebenfalls häufiger nachweisbar ist als vergleichsweise in der angrenzenden Steiermark und im Einzugsgebiet der Univ.-Kinderklinik Erlangen, wo bereits durch frühere Untersuchungen die entsprechenden Genfrequenzen für diesen angeborenen Stoffwechseldefekt vorliegen.

Bei 4 Probanden aus dem Reservat Torony lagen die Galaktokinaseenzymaktivitäten unter der 2s-Grenze des Mittelwertes und wurden somit als Heterozygote betrachtet. Daraus wurde eine Homozygotenfrequenz von 1:318 000 berechnet.

Frühere Untersuchungen in der Steiermark ergaben eine Homozygotenfrequenz für den Galaktokinasedefekt von 1:63 000 und in Franken von 1:126 000.

Damit kommt also der Galaktokinasedefekt bei den Zigeunern des Reservates Torony sogar seltener vor als in den anderen Gebieten. Zumindest bei dieser Untersuchung bestätigt sich die Aussage nicht, daß der Galaktokinasedefekt bei Zigeunern häufiger vorkomme.

VIII. Literaturverzeichnis

- 1) Avcin, M.:
Gypsy isolates in Slovenia
J. biosoc. Sci. 1, 221 (1969)
- 2) Beutler, E.:
Red cell metabolism - A manual of biochemical methods
Grune & Stratton, New York - London, (1971)
- 3) Beutler, E., N.V. Paniker, F. Trinidad:
The assay of red cell galactokinase
Biochem. Med. 5, 325, (1971)
- 4) Beutler, E., F. Matsumoto, W. Kuhl, A. Krill,
N. Levy, R. Sparkes, M. Degnan.:
Galactokinase deficiency as a cause of cataracts
New Engl. J. Med. 288, 1203 (1973)
- 5) Cohn, M.R., Segal, S.:
Galactose metabolism and its regulation
Metabolism, 22, 4 (1973)
- 6) Cook, J.G.H., Don, N.A., Mann, T.P.:
Hereditary galactokinase deficiency.
Arch. Dis. Childh. 46, 465 (1971)
- 7) Cuatrecasas, P., Segal, S.:
Mammalian galactokinase. Developmental and adaptive
characteristics in the rat liver.
J. biol. Chem. 240, 2382 (1965)
- 8) Dahlquist, A., Gamstorp, J., Madson, H.:
A patient with hereditary galactokinase deficiency.
Acta paediat. Scand. 59, 669 (1970)

- 9) Fischer, W., Weinland, H.:
Stoffwechsel der Galaktose und ihrer Derivate.
Gg. Thieme Verlag, Stuttgart (1965)
- 10) Gesche, M., Menne, F.:
Quantitative enzymatische Bestimmung der Galaktokinaseaktivität im Erythrozytenhämolysat.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10, 430 (1972)
- 11) Gitzelmann, R.:
Deficiency of erythrocyte galactokinase in a patient with galactose diabetes.
Lancet II, 670 (1965)
- 12) Gitzelmann, R.:
Hereditary galactokinase deficiency, a newly recognized cause of juvenile cataracts.
Pediat. Res. 1, 14 (1967)
- 13) Gitzelmann, R., Curtius, H.C., Müller, M.:
Galactitol excretion in the urine of a galactokinase deficient man.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 437 (1966)
- 14) Kaloud, H., Sitzmann, F.C., Mayer, R., Paltauf, F.:
Klinische und biochemische Befunde bei einem Kleinkind mit hereditärem Galaktokinase-Defekt.
Klin. Pädiat. 185, 18 (1973)
- 15) Kaloud, H., Sitzmann, F.C., Paltauf, F., Mayer, R.:
Die Sippe einer Patientin mit Galaktokinase-Defekt.
Klin. Pädiat. 186, 1 (1974)
- 16) Kaloud, H., Sitzmann, F.C.:
Vergleichende Genfrequenzuntersuchungen für den Galaktokinasedefekt in der Steiermark und in Franken
Z. Kinderheilk. 116, 185 (1974)

- 17) Kaloud, H., Sitzmann, F.C.:
Ergebnisse klinischer und biochemischer Untersuchungen bei einer Sippe mit Erkrankungen an Galaktosämie.
Beiheft Archiv Kinderheilk. 64
Enke Verlag Stuttgart (1971)

- 18) Kaloud, H., Sitzmann, F.C.:
Genfrequenz der hereditären Galaktosämie unter Berücksichtigung der Duarte-Variante.
Z. Kinderheilk. 113, 705 (1972)

- 19) Kerr, M.M., Logan, R.W., Cant, J.S., Hutchinson, J.H.:
Galactokinase deficiency in a newborn infant.
Arch. Dis. Childh. 46, 864 (1971)

- 20) Kraus, H., Mönch, E.:
Enzymatische Methoden zur Diagnose der Galaktosämie und des Galaktokinasemangels.
Klin. Wschr. 48, 437 (1970)

- 21) Leloir, L.F.:
The enzymatic transformation of uridine diphosphat glucose into a galactose-derivate.
Arch. Biochem. 33, 186 (1951)

- 22) Levy, N.S., Krill, A.E., Beutler, E.:
Galactokinase deficiency and cataracts.
Amer. J. ophthalm. 74, 1 (1972)

- 23) Linneweh, F., Schaumlöffel, E., Vetrella, M.:
Galaktokinasedefekt bei einem Neugeborenen.
Klin. Wschr. 48, 31 (1970)

- 24) Mathai, C.K., Beutler, E.:
Biochemical characteristics of galactokinase from adult and fetal human red cells.
Enzymologica 33, 224 (1967)

- 25) Mayes, J.S., Guthrie, R.:
Detection of heterozygots for galactokinase deficiency
in a human population.
Biochem. Genet. 2, 219 (1968)
- 26) Mellman, W.J., Tedesco, T.A., Feigl, P.:
Estimation of gene frequency of the Duarte variant
of galactose-1-phosphat uridyl transferase.
Hum. Gent. 32, 1 (1968)
- 27) Monteleone, J.A., Beutler, E., Monteleone, P.L.,
Utz, C.L., Casey, P.C.:
Cataracts, galactosuria and hypergalactosämia due
to galactokinase deficiency in a child.
Amer. J. Med. 50, 403 (1971)
- 28) Ng, W.G., Donnell, G.N., Bergren, W.R.:
Galactokinase activity in human erythrocytes of
individuals at different ages.
J. Lab. clin. med. 66, 115 (1965)
- 29) Oberman, A.E., Wilson, W.A., Frasier, S.D., Donnell,
G.N., Bergren, W.R.:
Galactokinase-deficiency cataracts in identical twins.
Amer. J. ophthalm. 74, 5 (1972)
- 30) Pickering, W.R., Howell, R.R.:
Galactokinase deficiency: Clinical and biochemical
findings in a new kindred.
J. Pediatr. (St. Louis) 81, 50 (1972)
- 31) Quan-Ma, R., Wells, W.W.:
The distribution of galactitol in tissues of rats
fed galactose.
Biochem. Biophys. Re. Commun. 20, 486 (1965)

- 32) Scheibenreiter, S., Thalhammer, O.:
Galaktosämie meist foudroyant verlaufend.
Wien. Klin. W.schr. 84, 93 (1972)
- 33) Sitzmann, F.C., Kaloud, H., Teubl, J., Müller, H.E.:
Die Aktivität des Enzyms Galaktokinase in den Erythrozyten gesunder Kinder und Erwachsener.
Klin. Päd. 185, 6 (1973)
- 34) Thalhammer, O., Gitzelmann, R., Pantlitschko, M.:
Hypergalactosämia and galactosuria due to galactokinase deficiency in a newborn.
Pediatrics 42, 441 (1968)
- 35) Thalhammer, O., Scheiber, V.:
Untersuchung über die Häufigkeit angeborener Stoffwechselanomalien in Ost- und West-Österreich.
Humangenetik 15, 145 (1972)
- 36) Tedesco, T.A., Mellman, W.J.:
Galactose-1-phosphate uridylyltransferase and galactokinase activity in cultured human diploid fibroblasts and peripheral leucocytes.
J. Clin. Invest. 48, 2390 (1969)
- 37) Universitätsklinik Heidelberg:
Collective results of mass screening for inborn metabolic errors in eight European countries.
Acta paediat. scand. 62, 413 (1973)
- 38) Vigneron, C.C., Marchal, C., Deifts, M., Vidailhet, M., Neimann, N.:
Deficit partial et transitoire en galaktokinase erythrocytaire chez un nouveau-ne.
Arch. fran. Pediat. 27, 523 (1970)

Herrn Prof. Dr.med. F.C. S i t z m a n n danke ich für die Überlassung des Themas und seine stets freundliche wissenschaftliche Beratung.

Herrn Prof. Dr.med. A. W i n d o r f e r , dem Direktor der Kinderklinik, danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Labor.

Herrn Prof. Dr.med. z u r H a u s e n , dem Vorstand des virologischen Institutes, danke ich für die Benutzung des TriCarb Szintillationsspektrometers.

Lebenslauf

Am 25.9.1944 wurde ich als Sohn des Angestellten Hans Seibert und Irmgard Koopmann in Hamburg-Harburg geboren. Von 1950 bis 1955 besuchte ich die Volksschule in Nabburg. Danach war ich Schüler des humanistischen Gymnasiums in Weiden. Nach der 7. Klasse begann ich eine Lehrzeit als Bankkaufmann in Nabburg und legte 1965 die Gehilfenprüfung ab.

Anschließend absolvierte ich den Grundwehrdienst bei der Bundeswehr.

Im Oktober 1967 trat ich in das Nürnberg-Kolleg ein, wo ich 1970 das Abitur bestand.

Im Sommersemester 1970 begann ich das Studium der Medizin an der Universität in Erlangen, das ich im Januar 1976 mit dem Staatsexamen abschloß.

Erlangen, im Mai 1976

Hans-Dieter Seibert

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990